

EINE NEUE ARBEITSMETHODE
ZUR GEWINNUNG VON MENSCHLICHEM,
NATIVEN NASENSEKRET
UND ERSTE EIWEISSCHEMISCHE
UNTERSUCHUNGEN

Brigitta Arnold

1979

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 • 8000 München 5 • Telefon 268177

AUS DER KLINIK FÜR HALS-, NASEN- UND OHRENKRANKHEITEN
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. H. H. NAUMANN

EINE NEUE ABNAHMEMETHODE
ZUR GEWINNUNG VON MENSCHLICHEM,
NATIVEN NASENSEKRET
UND ERSTE EIWEISSCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Brigitta Arnold
aus Niederaudorf

München 1979

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. H. EICHNER
Dekan: Prof. Dr. med. W. SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 6.11.1979



Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit
gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554612_0077

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
A) Einleitung	2
B) Problematik	4
C) Theoretische Grundlagen	8
I) Gesamteiweißbestimmung	8
II) Diskelektrophorese	8
III) Bestimmung der Immunglobuline	11
D) Praktische Ausführungen	13
I) Patientengut	13
II) Abnahmemodus	14
III) Gesamteiweißbestimmung	25
1) Methode	25
2) Ergebnisse	26
3) Diskussion	27
IV) Diskelektrophorese	30
1) Methode	30
2) Ergebnisse	36
3) Diskussion	40
V) Bestimmung der Immunglobuline	47
1) Methode	47
2) Ergebnisse	49
3) Diskussion	50
E) Zusammenfassung	53
Literaturverzeichnis	55

A) E I N L E I T U N G

Die respiratorisch vegetativ gesteuerte Funktion der Nase ist vielfältig. Sie reguliert den Atemstrom und stellt somit eine wichtige Verbindung zwischen Außenwelt und Körper dar.

Durch die Abgabe von Nasensekret aus den tubuloalveolären Drüsen der Nasenschleimhaut wird die Atemluft angefeuchtet, durch unterschiedliche Blutfüllung der Schleimhäute und Schwellkörper der Muscheln wird sie erwärmt, durch den vom Flimmerepithel der Nasenschleimhaut unterhaltenen Sekretstrom der zum Rachen hingerichtet ist, wird sie gereinigt.

Die Nasennebenhöhlen sind von wichtiger Bedeutung als Resonanzorgan der Stimme, als olfaktorisches Organ, als Schockabsorptionsorgan zum Schutz der Sinnesorgane, als thermisches Isolationsorgan für die Nervenzentren, zur Balancierung des Gesichtswachstums und zur Erleichterung des Kopfgewichtes.

Zur Erforschung dieser wichtigen Aufgaben bietet sich die Untersuchung der vegetativen Steuerung der Nasenschleimhaut und deren Sekretproduktion an. Außerdem ist die Beschaffenheit der Nasenschleimhaut und des Nasensekretes von Interesse.

Ursprung und Zusammensetzung des menschlichen Nasensekretes sind bisher noch nicht zufriedenstellend untersucht worden (16, 24, 25). Becherzellen und gemischte tubuloalveoläre Drüsen in der Tunica propria sind primär für die Sekretion verantwortlich.

Inwieweit durch Transsudation bzw. Exsudation Serumbestandteile in das Nasensekret gelangen, ist bei normaler Schleimhautsekretion noch nicht endgültig geklärt.

INGELSTEDT und IVSTAM (13, 14) fanden nach intravenöser Injektion von Fluorescein an der normalen Nasenschleimhaut keine Fluoreszenz. Bei akuten Entzündungen und allergischen Rhinitiden konnten sie jedoch eine Fluoreszenz der Schleimhautoberfläche feststellen (30, 31).

RYLEY und BROGAN markierten Albumin mit Fluorescein und nahmen das im Nasensekret vorhandene Albumin als Gradmesser für die Transsudation.

BONOMO und D'ADDABBO (3) bestätigten dieses Ergebnis mit radioaktiv markiertem Albumin.

Auch NEGUS und CRAMER (26, 6, 7) messen der Transsudation eine große Bedeutung als dem Ursprung des Nasensekretes zu.

Problematisch war bisher, für die Gewinnung von reinem Nasensekret eine geeignete Methode zu finden.

B) PROBLEMATIK:

Die Voraussetzung für die Untersuchung von Nasensekret ist eine rationelle Methode zur Gewinnung von reinem Nasensekret, wobei zu beachten ist, den Patienten soweit wie möglich zu belasten und keinen allzu starken Reiz auf die Nasenschleimhaut auszuüben. Es würde eine übermäßig starke Sekretion auslösen und somit die lokalisatorisch gezielte Gewinnung von Sekret unmöglich machen.

Andererseits muß bei der Abnahme eine Sekretmenge von mindestens 100^{µl} gewährleistet sein um die nachfolgenden Untersuchungen des Nasensekretes möglich zu machen. Des weiteren sollte das abgenommene Sekret so aufbereitet werden, daß sich die zu messenden Parameter bestmöglich, d.h. ohne zu viele Fehlerquellen darstellen lassen.

Bisher wurden in der Literatur drei Methoden beschrieben:

- 1) Die Gewinnung des Nasensekretes durch forciertes Ausschneuzen der Nase in eine Glasschale. Da normalerweise die Nasenschleimhaut nur von einem dünnen Sekretfilm bedeckt ist, kann durch diese Methode bei Normalpersonen kein Sekret gewonnen werden, d.h. es ist nur bei pathologisch veränderter Nasenschleimhaut möglich. Auch erhält man lediglich ein nicht spezifisch lokalisiertes Sekret.

2) Die nasale Lavage.

Prinzip dieser Methode ist es, durch Spülung der Nasenhaupthöhlen und Wiederauffangen der Spülflüssigkeit das Nasensekret zu gewinnen.

Diese Methode wurde hauptsächlich bisher bei der Gewinnung von Nasensekret verwendet. Dabei kann die Nasenspülung auf zwei Arten erfolgen. Einmal wird bei rekliniertem Kopf das Nasenlumen mit 5 ml Aqua dest. ANDERSEN (1), 10 ml Lactat-Ringerlösung ROSSEN, ISHIZAKA, TURK, TSE (28, 29, 15, 35, 34) gespült, wobei das Gaumensegel angehoben ist und danach die Spülflüssigkeit durch Ausschneuzen der Nase in ein Glasgefäß gesammelt.

Eine weitere Methode der Nasenspülung ist die von COHEN (5) und SMITH (2) beschrieben:

Es wird ein Nasengang mit isotoner Tris-NaCl-Lösung wie es COHEN bei Kindern beschreibt, gespült und durch Einführen eines zweiten Katheters bis zum Epipharynx simultan am Nasenende das Sekret abgesaugt.

3) Nasensekretgewinnung durch Einlegen von Filterpapier, bzw. Watte und anschließende Eluation des Nasensekretes durch Puffer- bzw. Kochsalzlösung.

Es kann auch das Gewicht des eingelegten Filterpapiers bzw. der Watte vor und nach Einlegen in den Nasengang bestimmt werden, wie es MELON und MYGIND (18, 23) durchführten, um somit die quantitative Sekretbestimmung zu erhalten.

Diese Methode wurde von REICHERT und SCHORN (32, 33) zur Bestimmung von Proteaseinhibitoren und enzymatischen Bestimmungen des Nasensekretes beschrieben und verwertet.

Alle bisher beschriebenen Methoden haben jedoch infolge der Abnahmetechnik immer mit hochverdünnten Nasensekretlösungen zu tun. Viele Schritte (Verdünnung, Anreicherung, Dialyse, Lyophilisation) sind erforderlich um zu den endgültigen Ergebnissen zu kommen.

Auf Grund dieser Schwierigkeiten waren bisher routinemäßig Absolutbestimmungen von bestimmten Eiweißstoffen bzw. Elektrolyten im Nasensekret nicht möglich.

Durch die unten beschriebene neue Abnahmemethode kann auf einfache Weise Nasensekret gewonnen werden, das bezüglich seiner Eiweißzusammensetzung und Elektrolytzusammensetzung quantitativ und qualitativ ausgetestet werden kann. Somit ist die Möglichkeit gegeben, erstens Nasensekret unterschiedlicher Lokalisation zu vergleichen und zweitens normales Nasensekret solchen unterschiedlicher Pathogenese gegenüberzustellen.

Zudem war bisher die Bestimmung des Eiweißgehaltes und der Immunglobuline des Nasensekretes, sowie die Charakterisierung der einzelnen Eiweißfraktionen mittels Diskelektrophorese im deutschen, englischen und französischen Sprachraum nicht beschrieben worden.

NASENSEKRET - ABNAHMETECHNIKEN

- 1.) Forciertes Ausschneuzen
- 2.) Nasale Waschung
(ROSSEN, ISHIZAKA, TURK, TSE
WALDMANN, YUNGINGER)
- 3.) Einlegen von Filterpapier
bzw. Watte
(LORIN, MYGIND, REICHERT,
SCHORN)

ABNAHMETECHNIK REICHERT/SCHORN

Eluation der Watte in Puffer

Dialyse

Lyophilisation

Trockengewichtsbestimmung

Weitere chemische Analysen

Tab.: 1 Zusammenfassung der bisherigen Abnahme-
methoden von menschlichem Nasensekret

C) THEORETISCHE GRUNDLAGEN

I) Gesamteiweißbestimmung:

a) Die Eiweißbestimmung wurde zunächst mit der für Serumeiweißbestimmungen routinemäßig angewendeten Biuret-Methode durchgeführt, die auf der Tatsache beruht, daß Eiweiß mit Kupfer-Ionen in alkalischer Lösung einen Farbkomplex bildet.

Für weitere Eiweißbestimmungen verwendeten wir eine Methode, die direkt die Extinktion der eingesetzten Eiweißlösung mißt, ohne vorher abgelaufene Farbreaktion wie bei der Biuret-Methode.

II) Diskelektrophorese:

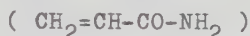
Die Diskelektrophorese ist z.Zt. im Vergleich zur Papier- und Celluloseacetatfolienelektrophorese die leistungsfähigste Trennmethode von Eiweißstoffen. Durch die Diskontinuität der Pufferlösungen, sowie den Molekularsiebeffekt der Acrylamidgelstruktur ist eine exakte Trennung auch von eiweißarmen Flüssigkeiten bei Einsatz kleiner Mengen der zu testenden Eiweißlösung möglich.

Diese Methode wurde erstmals von ORNSTEIN (27) und DAVIS (8) beschrieben und ist bisher zur Trennung nahezu aller Körperflüssigkeiten angewendet worden. MAURER (17).

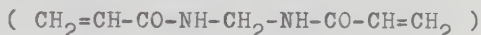
Dieselbe Methode wurde bisher auch von EICHNER (9,10) zur Auftrennung von Speicheldrüsenproteinen verwendet. Als Screeningmethode sollte sie in der vorliegenden Untersuchung eingesetzt werden, um herauszufinden in wie weit interindividuelle Schwankungen der Nasensekretzusammensetzung durch die diskelektrophoretische Auftrennung erkennbar sind.

Bei anderen Elektrophoresemethoden dient der poröse Träger, der die Pufferlösung aufnimmt, nur zur Verhinderung der Konvektion, dagegen hat er bei der Diskelektrophorese darüber hinaus eine entscheidende Bedeutung bei der Auftrennung der Proteine. Dieser Träger ist ein kleinporiges Gel, das je nach Größe und Gestalt der Proteinmoleküle eine unterschiedliche Wirkung auf deren Beweglichkeit ausübt (Molekularsiebeffekt).

Als Gele dienen vernetzte Polyacrylamide, die unmittelbar vor dem Versuch aus Acrylsäureamid



und einem Vernetzer, dem N, N-Methylen-Bis-Acrylsäureamid



hergestellt werden.

In einer Lösung, die diese beiden Substanzen enthält, wird die Polymerisation durch Radikale eingeleitet, die durch Zusatz von Peroxiddisulfat erzeugt werden. Wie bereits die Abkürzung ausdrückt, liegt bei der Diskelektrophorese ein diskontinuierliches Trennsystem hinsichtlich dem pH Wert des Gels und dem des Laufpuffers vor. Durch diese pH Diskontinuitäten werden Startzonen mit sehr geringer Schichtdicke erzeugt. Diese haben den Vorteil, daß gerade bei niedrigen Eiweißkonzentrationen der aufgetragenen Proben eine ausgezeichnete Trennscharfe erreicht wird.

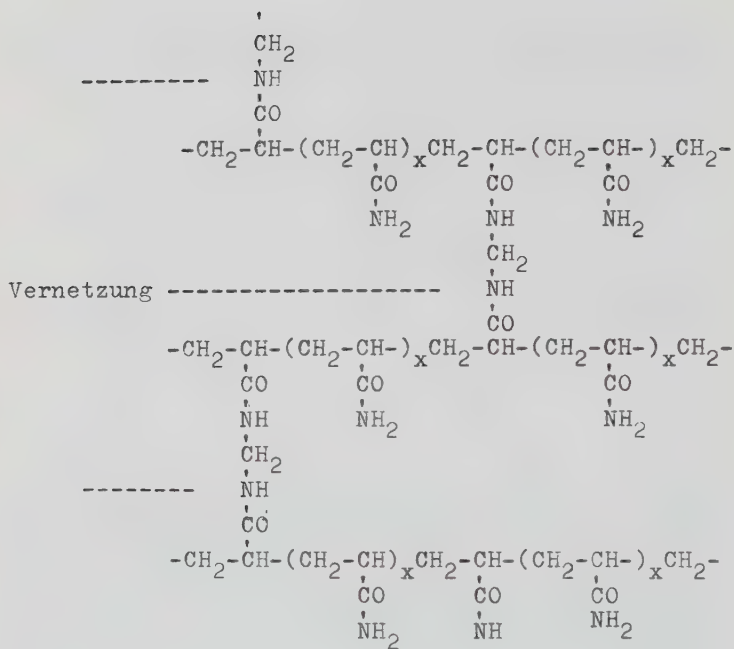


Abb. 1 : Strukturformel vom Aufbau des
Polyacrylamidgels

III) Bestimmung der Immunglobuline:

a) Biologische Eigenschaften der drei Immunglobulin-Hauptklassen.

Detaillierte Tabellen und Angaben über Molekulargewichte und Eigenschaften der Immunglobuline ergibt das Buch "KABAT and MEYER'S EXPERIMENTAL IMMUNCHEMISTRY" (4).

Neben den hier in Tabellen Nr. 1 aufgeführten biologischen Eigenschaften sei noch erwähnt, daß ein Austausch von IgG zwischen Blut und extravasculärer Flüssigkeit leicht stattfinden kann.

IgA hat die Tendenz seine 7-S-Moleküle zu Verbindungen mit einer höheren Sedimentationskonstante zu aggregieren.

IgM findet sich bei Normalpersonen vor allem im Blut. Infolge seines hohen Molekulargewichtes kann es nur bei einer Entzündung der Permeabilität der Kapillärwände aus der Blutbahn heraustreten. Es besitzt trotz seines hohen Molekulargewichtes eine ähnliche Grundstruktur wie IgA u. IgG.

b) Mancini-Test mit LC-Partigen^R Immundiffusions-Platten

Die Platten dienen zur quantitativen Bestimmung von Plasmaproteinen. Sie enthalten monospezifisches Antiserum gegen das zu bestimmende Globulin. Dieses Serum ist in einer gebrauchsfertigen Agargelschicht gelöst. In diese Agargelschicht sind 12 zylinderförmige Auftragestellen eingestanzte, in die, die zu untersuchenden Serum- bzw. Nasensekretproben gefüllt werden.

Die in den Proben enthaltenen Antigenmoleküle diffundieren radial in die Agargelschicht mit dem darin enthaltenen homogen Antiserum, wobei sich auf Grund der Antigenantikörperreaktion Precipitationsringe bilden. Der nach einer bestimmten Zeit abzulesende Durchmesser dieser Ringe ist der Menge des Antigens bzw. des zu bestimmenden Proteins bei vorgegebener Antiserumkonzentration im Reaktionsgel direkt proportional (11).

D) P R A K T I S C H E A U S F Ü H R U N G

I) P a t i e n t e n g u t :

Insgesamt wurden 81 Patienten, sowohl Männer als auch Frauen im Alter zwischen 18 und 69 Jahren untersucht.

Die Patienten lassen sich in folgende Gruppen aufteilen:

- 36 ambulante Patienten ohne eine Erkrankung im Nasenbereich,
- 35 stationäre Patienten ohne eine Erkrankung im Nasenbereich,
- 10 Patienten mit allergischer, akuter und vasomotorischer Rhinopathie.

Die stationären Patienten mit den Normalbefunden wurden präoperativ vor Ohroperationen bzw. plastischen Eingriffen untersucht, Nasenschleimhauterkrankungen wurden inspektorisch, Allgemeinerkrankungen laborchemisch und internistisch ausgeschlossen.

Die Abnahme erfolgte vormittags zwischen 10 und 12 Uhr, um die beschriebenen Cirkadianschwankungen HUGHES, MYGIND (12, 21, 22, 23) zu berücksichtigen.

II) A b n a h m e :

Nach endoskopischer Inspektion der Nasenschleimhaut und photographischer Dokumentation wurden kleine Filterpapierstreifen von 5 x 10 mm an anatomisch unterschiedlichen Stellen eingelegt: jeweils links und rechts im unteren Nasengang, am Nasenseptum und an der oberen Muschel. Das Problem bei dieser Methode war, daß Filterpapierstreifen von dieser Größe nur eine für nachfolgende Untersuchungen nicht ausreichende Menge von etwa 5 - 10 μ l Nasensekret aufsaugten. Der Versuch mit größeren Filterpapierstreifen zu arbeiten, scheiterte insofern, als diese einen zu starken Reiz auf den Probanden ausübten, der zum Teil eine starke Hypersekretion bewirkte, zum Teil zum Niesen führte, was die erwünschten lokalisatorischen Unterschiede verwischte.

Bei einer anderen Patientengruppe wurde ein Wattestreifen von 5 x 30 mm in die Nasenhöhle eingebracht. Es wurde ohne mit der Pinzette die Schleimhaut zu tangieren und ohne mit der Watte die Schleimhaut abzuwischen in den mittleren Nasengang eingelegt und 20 Minuten belassen.

Danach wurde der Watte- bzw. Filterpapierstreifen in ein Plastiknetz mit 80 nm Porenweite gewickelt und in einem Spitz-Zentrifugenglas auf ein sich darin befindliches Kunststoffsieb gelegt. (Abb.: 3)

Die Watte wurde dann bei 5 000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert.

Das Nasensekret sammelte sich bei der Zentrifugation durch die Siebe an der Spitze des Zentrifugenglases. Es ist makroskopisch weißlich opaleszent, manchmal bis wasserklar, aber viskös.

Nach Abschluss der Zentrifugation wurden die Siebe mit den Wattestreifen entfernt und das Nasensekret mit einer Pipette aufgenommen, gemessen und nach Einbringen in ein verschließbares Plastikhütchen sofort verarbeitet.

Im Gegensatz zur bisherigen Abnahmetechnik steht für die Messung das reine, unverdünnte Sekret zur Verfügung. Die Messung kann dabei qualitativ und quantitativ durchgeführt werden (Abb.:2-9), und es können lokalisatorische Vergleiche des Nasensekretes angestellt werden.

DIE NEUE ABNAHMETECHNIK

Zentrifugation der in ein Plastiknetz gewickelten Watte über ein Sieb in einem Spitz-Zentrifugenglas.

Messung des gewonnen Nativsekretes.

Analyse (Gesamteiweißbestimmung, Disk-elektrophorese, Immunglobulinbestimmung).

Tab.: 2 Zusammenfassung der neuen Abnahmemethode von menschlichem Nasensekret.

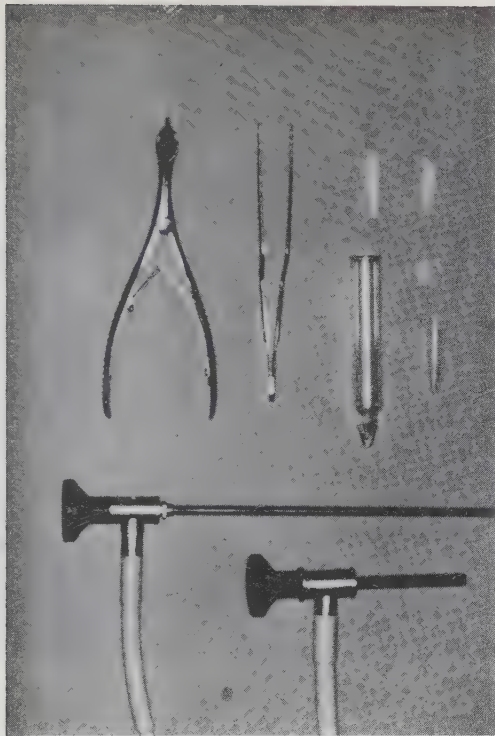


Abb.: 2 Nasenspekulum und gebogene Pinzette zum Einlegen von Filterpapier, bzw. Watte. Spitz-Zentrifugenglas, Watte und Plastiksieb zum Auszentrifugieren des Nasensekretes, Nasenendoskop.

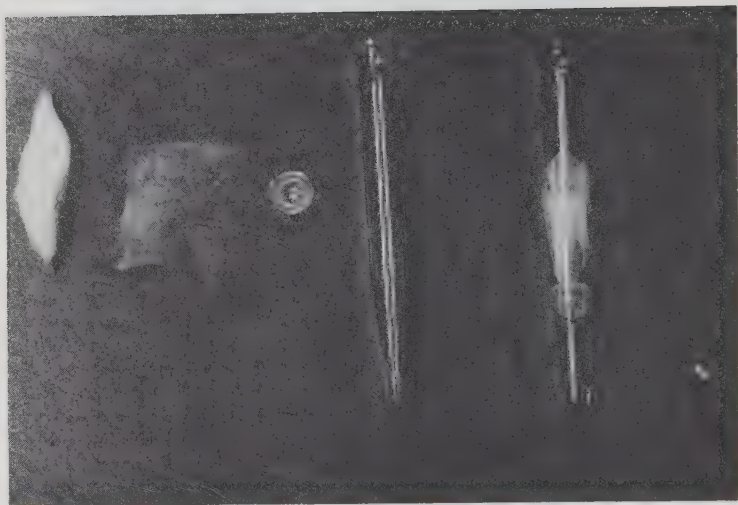


Abb.: 3 Der mit Nasensekret getränkte Wattestreifen wird zunächst in ein Plastiknetz gewickelt und anschließend über einem Plastiksieb in das Spitz-Zentrifugenglas gebracht.

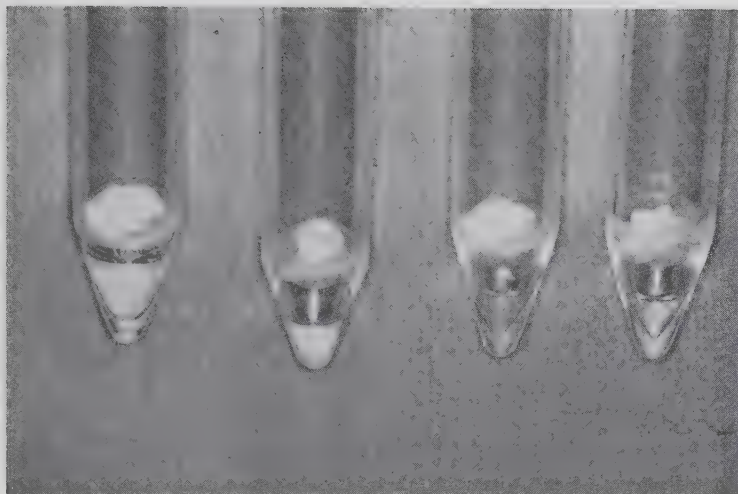


Abb.: 4 Nach 30 minutiger Zentrifugation bei 5 000 Umdrehungen pro Minute sammelt sich das reine, unverdünnte Nasensekret an der Spitze des Zentrifugenglases an.

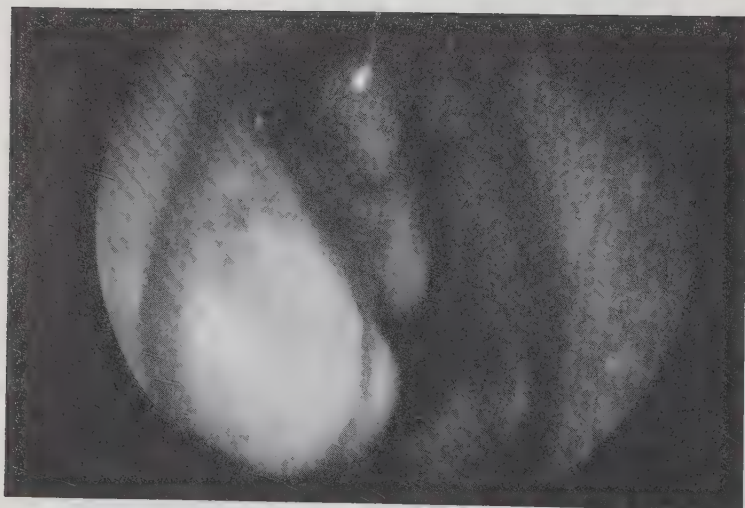


Abb.: 5 Rechter Nasengang mit
Nasenseptum—
Mittlerer Muschel—
Unterer Muschel—



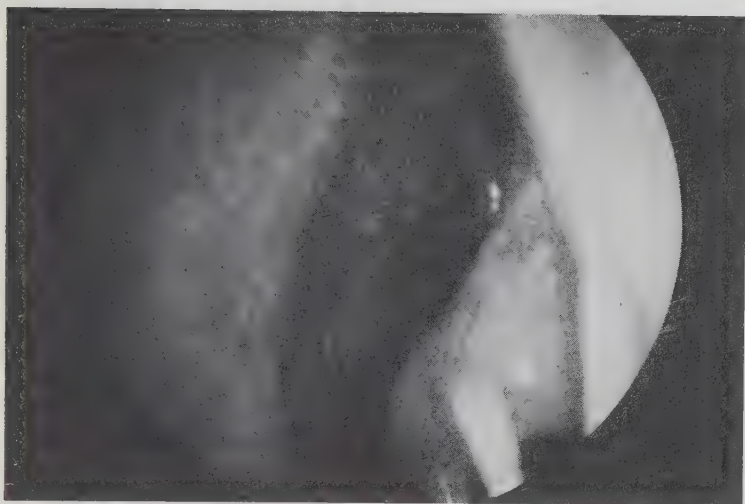
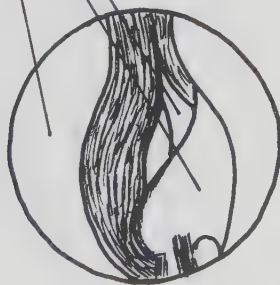


Abb.: 6 Linker Nasengang mit

Mittlerer Muschel

Unterer Muschel

Nasenseptum



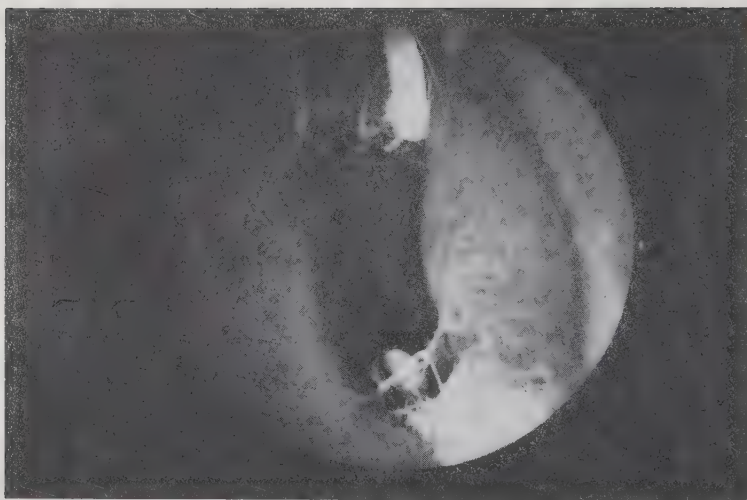
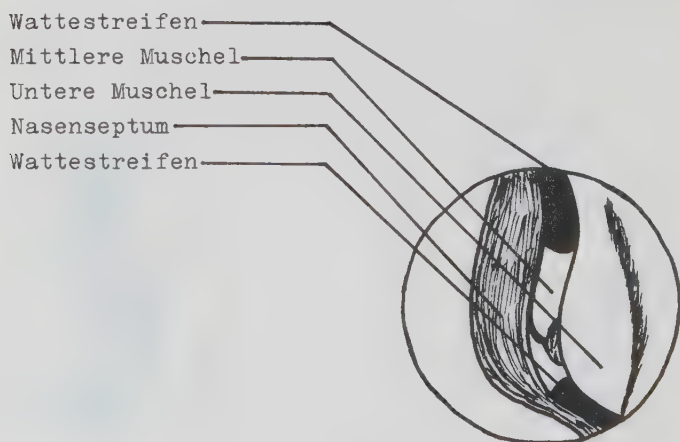


Abb.: 7 Linker Nasengang: es sind 2 Wattestreifen eingelegt, einer im mittleren, einer im unteren Nasengang.



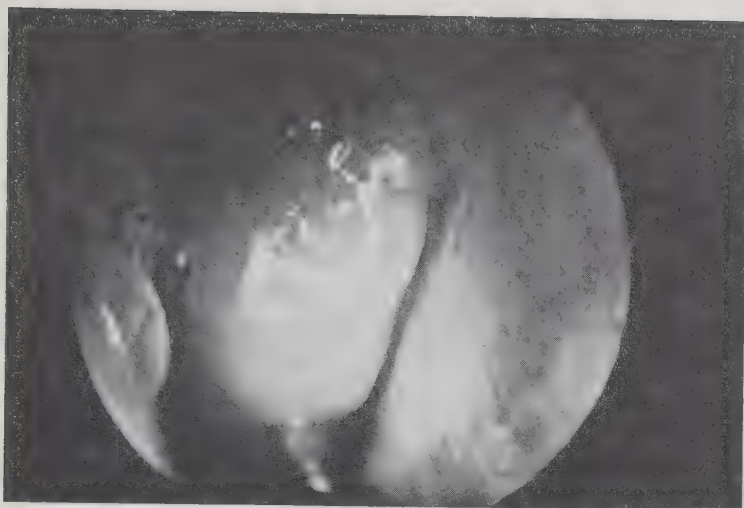
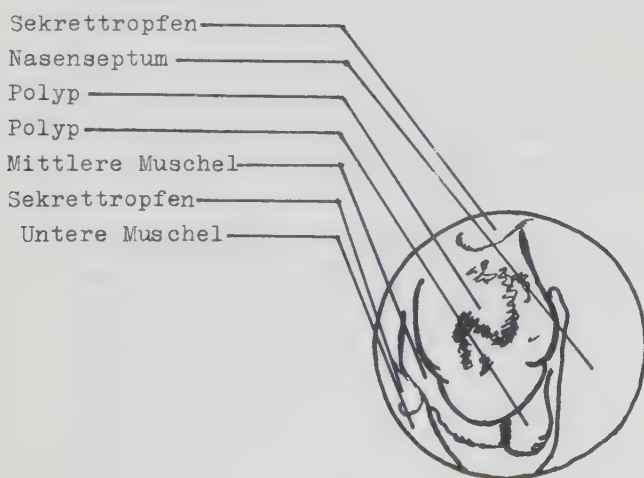
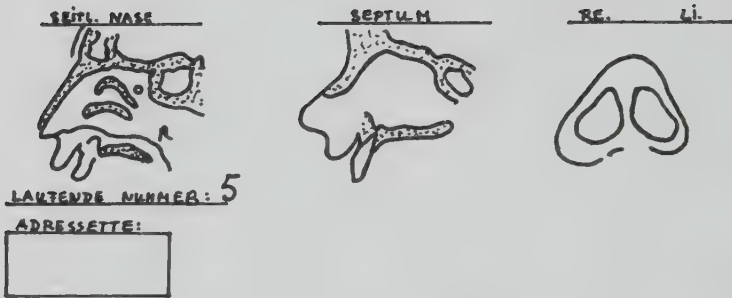


Abb.: 8 Rechter Nasengang





<u>DATUM DER ABNAHME:</u>	<u>UHRZEIT:</u>			
<u>SEKRET NR. + LOKALISATION</u>	<u>UL 25</u>	<u>OL 26</u>	<u>UR 27</u>	<u>SERUM 28</u>
<u>SCHLEIMHAUTREKHAFTENHEIT</u>	<u>08</u>			
<u>DAUER DER SEKRETABNAHME</u>	<u>20 min</u>			
<u>SEKRETMENGE</u>	<u>90 µl</u>	<u>60 µl</u>	<u>50 µl</u>	<u>3 ml</u>
<u>MAKROSKOPISCHES AUSSEHN</u>	<u>farblos</u>	<u>farblos</u>	<u>farblos</u>	<u>farblos</u>
<u>WURDE KONTAMINIERT?</u>	<u>keine die Nase betreffende</u>			

Abb.: 9 Schema zur Registrierung und späteren Auswertung der gewonnenen Nasensekrete.

UL = Unterer Nasengang links

OL = Oberer Nasengang links

UR = Unterer Nasengang rechts

III) Gesamteiweißbestimmung

1) Methoden:

a) Biuretmethode:

Material:

Probenküvetten

Referenzküvetten

Reagenzgläser

Biuretreagenz: 0,1 N NaOH, 16 mmol/l K-Na-
tartrat, 15 mmol/l KJ, 6 mmol/l
CuSO₄

Vitatron Modularphotometer

Durchführung:

In ein Reagenzglas werden 0,1 ml Nasensekret oder Serum und 5,0 ml Biuretreagenz pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 20 - 25° C wird die Extinktion der Proben gegen reines Biuretreagenz als Leerwert bei einer Wellenlänge von Hg 546 nm gemessen. Die Konzentration von Gesamteiweiß kann dann nach der Formel $C = 19 \times E - \text{Probe}$ berechnet werden.

b) Direkte spektrophotometrische Eiweißbestimmung:

Material:

DU-200-Doppelstrahlspektrophotometer

der Firma SHIMADZU

Referenzküvette

Probenküvetten

Aqua dest.

Durchführung:

10 Nasensekret wurden in die Probenküvetten pipettiert und zu einem Endvolumen von 3 ml mit Aqua dest. aufgefüllt. Anschließend wurde die Probe im Doppelstrahlspektrophotometer im Vergleich zur Referenzküvette, die mit reinem Aqua dest. gefüllt worden war, gemessen.

Als Meßbereich wurde der Bereich von 340-230 nm gewählt.

Vorherige orientierende Messungen ergaben, daß sich die Eiweißextinktion im Bereich von 280 nm als deutlicher Peak vorfindet. Es wurde deshalb, nach Messung der Standardseren, in verschiedenen Konzentrationen eine Eichkurve aufgestellt, und an Hand dieser die jeweiligen Extinktionskurven der Nasensekrete ausgemessen und ihr Eiweißgehalt berechnet.

2) Ergebnisse:a) Biuretmethode:

Es konnten keine zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden, da die errechneten Werte der Gesamteiweißkonzentrationen beim Nasensekret einer starken Streuung unterworfen waren.

b) Direkte spektrophotometrische Eiweißbestimmung:

Durch die Bestimmung der Gesamteiweiße konnten wir bestätigen, daß die Eiweißkonzentration im Serum wesentlich höher ist als im Normalsekret.

Außerdem zeigt sich eine höhere Eiweißkonzentration im unteren Nasenbereich gegenüber dem Bereich der oberen Nasenmuscheln.

3) D i s k u s s i o n

Durch Gegenüberstellung der beiden Methoden zur Bestimmung der Gesamteiweißkonzentration des Nasensekretes konnte gezeigt werden, daß mit der herkömmlichen Biuretmethode keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden können, da bei den gegebenen Eiweißkonzentrationen des Nasensekretes mit einem anderen Umrechnungsfaktor gerechnet werden müßte.

Aus diesem Grunde ist die direkte spektrophotometrische Eiweißbestimmung vorzuziehen.

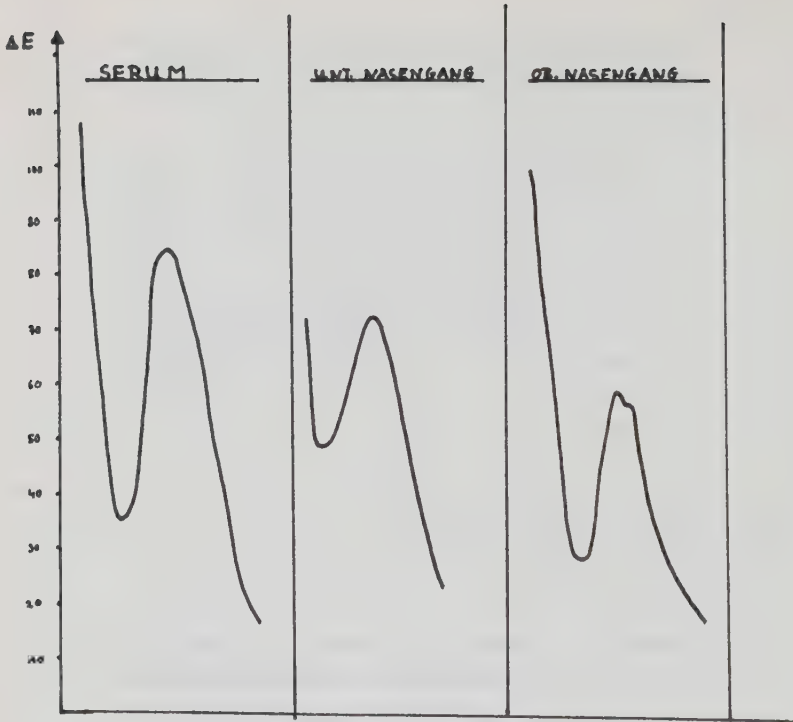


Abb.: 10 Densitometrische Darstellung der Gesamteiweißkonzentrationen von Serum und Nasensekret aus dem unteren und oberen Nasengang.

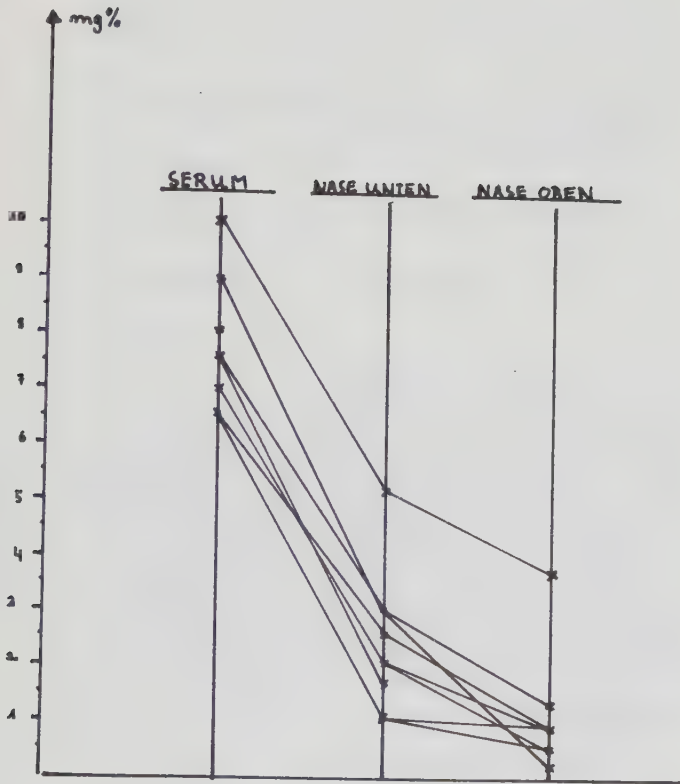


Abb.: 11 Vergleichende Tabelle der Gesamteiweißkonzentrationen von Serum, Nasensekret der oberen und Nasensekret der unteren Muscheln.

IV) Diskelektrophorese :1) Methode:Material und Geräte:

- 1) Gießröhrchen aus Glas ($\varnothing$ innen 6 mm,
 $\varnothing$ außen 9 mm, Länge 10 cm)
- 2) Trenngel: 7,5 %-iges Acrylamid-Mittel-
 Porgel pH 8,9
- 3) Elektrophoresepuffer pH 8,3
- 4) Elektrophoreseapparatur (WTW/Weilheim) (Abb.:12)

Herstellung des Trenngels:

Zur diskelektrophoretischen Auftrennung wurde ein 7,5 %-iges Mittelporgel mit pH 8,9 verwendet, das Proteingemische mit Molekulargewichten von 10^4 bis 10^6 auftrennt, und dessen optimaler Bereich Molekulargewichte von 3×10^4 bis 3×10^5 umfaßt, d.h. gut geeignet für Serumproteinauftrennung ist.

Grundlösungen:

pro 100 ml wässriger Lösung

- 1) 48 ml 1 n HCl
 36,6 g Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan
 0,8 g N,N,N,N - Tetramethyl-äthylendiamin
 (als Polymerisationsregler)

- 2) 30 g Acrylamid
0,8 g N, N - Methylen-bisacrylamid
- 3) 140 mg/100ml. Ammoniumperoxiddisulfat

Die Lösungen 1 und 2 können im Kühlschrank vorrätig gehalten werden, Lösung 3 muß frisch zubereitet werden

Lösung 1 und Lösung 2 wurden im Verhältnis 1:2 zusammengegeben. Unmittelbar vor dem Gießen der Gelröhrchen wurde diese Mischung mit Lösung 3, die Katalysatorwirkung besitzt, im Verhältnis 1:1 angesetzt. Das nun erhaltene Gemisch mußte unverzüglich verwendet werden.

Gießen der Gele:

Die gesäuberten Röhrchen (Laborwaschlösung, Aqua dest. - Spülung, Ofentrocknung) wurden an einer Seite mit Parafilm verschlossen und mit dem gießfertigen Gel zu etwa $\frac{4}{5}$ ihrer Länge gefüllt. Anschließend wurde mit 5 Tropfen Wasser überschichtet, damit das Gel unter Luftabschluß polymerisieren konnte. Zur Polymerisation benötigte die Mischung ca. eine Stunde. Jetzt wurde das Wasser abgesaugt und der Parafilm vom Röhrchenende entfernt.

Beschicken der Röhrchen:

Nach dem Füllen des unteren Teils der Elektrophoresekammer mit Puffer, wurden in dem oberen Teil die Röhrchen mit Gummiringen befestigt und beide Teile so aufeinander gesteckt, daß sich die Röhrchen in der Pufferlösung der unteren Kammer befanden. Um Luftbläschen zu vermeiden, wurden sodann mit einer Pipette, in das nicht mit Gel gefüllte Ende der Röhrchen, Pufferlösung eingebracht und schließlich auch die obere Kammer mit Puffer gefüllt.

10 μ l der Probe wurden mit 3 μ l einer Mischung aus Bromphenolblau und 40 %-igen Saccharoselösung versetzt und mit einer Mikroliterpipette vorsichtig in die Röhrchen unterschichtet (die Saccharoselösung erleichtert durch Erhöhung des spez. Gewichtes das Unterschichten, während Bromphenolblau durch seine Wanderung vor der Proteinfront den Fortgang der Elektrophorese anzeigt).

Herstellung des Puffers:

6 g Tris- (hydroxymethyl) - aminomethan und 8,8 g Glycin wurden zu einer 10 %-igen wässrigen Pufferlösung mit eingestelltem pH 8,3 verarbeitet.

Elektrophoresebedingungen:

Vorlauf: 10 Min. bei einer Stromstärke von 2 mA/Röhrchen.

Hauptlauf: 90 Min. bei 5 mA/Röhrchen.

Entfernen der Gele aus den Röhrchen und Anfärben der Proteinbanden:

Nach Beendigung des Laufes wurden die Gele aus den Glasröhrchen entfernt. Hierfür wurde eine lange, dünne Injektionsnadel mit abgeschliffener Spitze vorsichtig zwischen Glaswand und Gelschicht geschoben und eine 60 %-ige Glycerin-Wasser-Mischung bei gleichzeitiger Drehung des Röhrchens so lange injiziert, bis sich die Gele von der Glaswand lösten. Die Gele wurden mit Aqua dest. abgespült und 24 Stunden zur Färbung in Coomassielösung gelegt.

Herstellung der Coomassielösung:

1 %-ige Lösung von Coomassie Brilliant-blue^R in Aqua dest. wurde mit 10 %-iger Trichloressigsäure im Verhältnis 1:19 versetzt und filtriert. Pro Gel wurden ca. 20 ml. Färbelösung benötigt. Die Lösung wurde nach einmaligem Gebrauch verworfen.

Entfärbung:

Die überschüssige Farbe wurde durch Spülen der Gele in 7 %-iger Essigsäurelösung entfernt. Dieser Vorgang dauerte 36 Stunden. Die Entfärberlösung wurde mehrmals erneuert.

Aufbewahrung und Registrierung:

Zur Aufbewahrung wurden die Gele in dünne, mit 7 %-ger Essigsäurelösung gefüllte Glasröhrchen gebracht und mit Para-Film luftdicht verlossen. In diesem Zustand konnten sie photographisch oder densitometrisch dokumentiert werden.

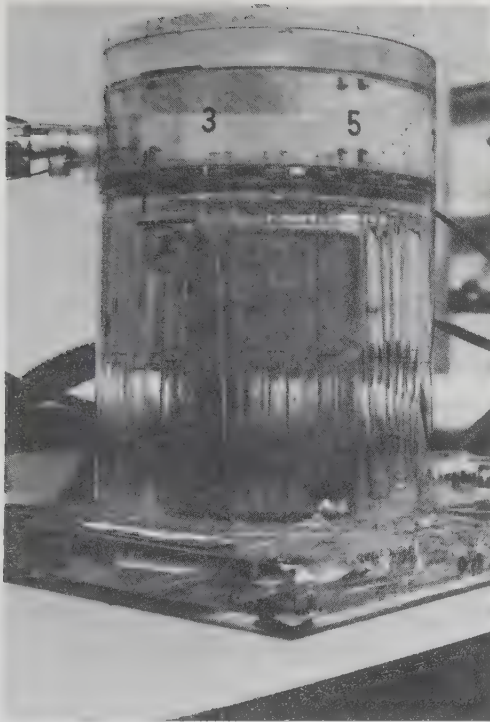


Abb.: 12 Elektrophoreseapparatur (WTW/Weilheim)
Die Proben werden oben (Kathode) aufgetragen
und wandern nach unten (Anode)

2) E r g e b n i s s e :a) Serum:

Wir konnten bei den diskelektrophoretisch aufgetrennten Serumproben maximal 16 Banden finden.

Einige Proteine sind wegen ihrer gleichen Ladungen und Molekülgrößen aufeinander gelagert. In diesem Falle sind die Banden als breite Zonen ausgebildet und es ist nicht möglich die Proteine voneinander zu unterscheiden, So z.B. ist das Alpha-I-Makroglobulin und die Haptoglobulinpolymeren auf die Immunglobuline GAM gelagert. Gut darzustellen dagegen sind das Anode, Kathode) Praealbumin, Albumin, Transferrin, Alpha-II-Makroglobulin und das Beta-Lipoprotein.

Die Alpha-II-Globuline wandern im Gegensatz zur Papier-Acetat-Folien-Elektrophorese trotz ihrer hohen Ladungen langsamer als die Beta-Globuline und finden sich z.Teil im Bereich der näher an der Kathode liegt. Dagegen wandern die Alpha-I-Globuline schneller. Dies beweist, daß durch den Molekularsiebeffekt bei der Diskelektrophorese die Molekülgröße eine wesentliche Rolle spielt. Außerdem finden sich spezifische Veränderungen der Hapto-Globulin-Typen und der GC-Proteine.

Beim Haptoglobin-II-Serum ist eine Bande, die schneller als Transferrin wandert, sichtbar.

Bei Haptoglobin-XXI-Serum tauchen eine Reihe von pikes im Bereich zwischen Alpha-II-Makroglobulin und Transferrin auf.

Bei Haptoglobulin-XXI-Seren finden sich einige Banden zwischen Alpha-II-Makroglobulin und Beta-Iipoprotein.

Bei G-XI kommt es im Präalbuminbereich zu einer eingipfligen und bei G-XXII zu einer zweigipfligen Bandenstruktur.

b) Normalsekrete:

Die diskelektrophoretisch aufgetrennten Nasensekretproben zeigten in der Regel einen quantitativ niedrigeren Eiweißgehalt, entsprechend eine geringere Anfärbbarkeit als die Serumproben.

Im kathodennahen Bereich finden wir drei, den Immunglobulinen entsprechende Banden.

In der Mitte des Gels entspricht eine charakteristische Bande dem Transferrin im diskelektrophoretisch aufgetrennten Serum.

Im anodennahen Bereich finden wir das Albumin von, dem Serum ähnlicher Bandenbreite und Farbintensität.

1) Normalbefunde Serum Nasensekret:

Im Allgemeinen ist zu sagen, daß bei den Normalbefunden der Eiweißgehalt der Seren kaum einer Schwankung, der der Nasensekrete einer starken Schwankung unterlegen ist, wobei man grundsetzlich behaupten kann, daß im Serum quantitativ wesentlich mehr eines einzelnen Eiweißes enthalten ist, und darüber hinaus auch mehr Eiweißarten gefunden werden können.

Präalbumin kann im Nasensekret nicht nachgewiesen werden.

Das Transferrin erscheint im Nasensekret als Doppelbande, die Bande der Immunglobuline sind, was deren Farbintensität betrifft, im Serum wesentlich stärker ausgebildet.

GC-Protein kann im Nasensekret nicht gefunden werden.

2) Lokalisatorische Unterschiede des Nasensekretes:

Im Bereich des Septums und des Nasenbodens zeigten sich in der Regel mehr Eiweißbanden. Im Bereich der oberen Muschel dagegen finden wir eine weniger stark ausgeprägte Albumin- und Transferrinbande. Die Ursache hierfür könnte eine stärkere Serumpermeation im Bereich der oberflächlich liegenden Venenplexus sein.

3) Nasensekrete bei allergischer Rhinopathie:

Die Bandenstrukturen sind in der Regel denen von Normalsekreten ähnlich. Der Eiweißgehalt ist deutlich niedriger als im Serum.

Im anodennahen Bereich finden wir Albumin, jedoch kein Präalbumin.

Im mittleren Bereich zeigt sich die bei Nasensekreten typisch zweigipflige Transferrinbande.

Im kathodennahen Bereich sind 3 - 4 Banden zu erkennen.

4) Nasensekrete bei akuter Rhinopathie:

Auch hier zeigt sich ein dem Normalsekreten ähnliches Bild. In der Regel finden wir noch schwächer ausgebildete Bandenstrukturen, was auf eine Eiweißminderung schließen läßt. Im anodennahen Bereich ist kein Präalbumin zu finden, das Albumin ist schwach ausgebildet. Die Transferrinbande ist meist nur einfach ausgebildet.

Im kathodennahen Bereich sind häufig nur zwei Banden zu finden.

5) Nasensekret bei vasomotorischer Rhinopathie:

Hier finden wir ein relativ eiweißreiches Sekret.

Im anodennahen Bereich wird kein Präalbumin gefunden. Das Albumin ist deutlich stärker ausgebildet als bei Normalsekreten.

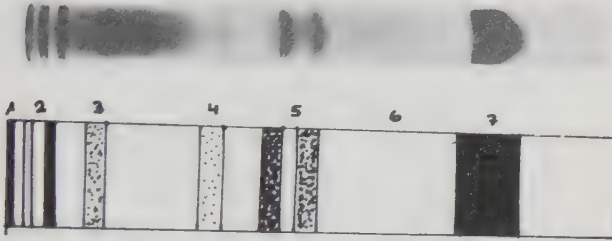
Im kathodennahen Bereich scharf abgegrenzte Immunglobuline.

3) D i s k u s s i o n :

Durch ein diskontinuierliches Trennsystem hinsichtlich des pH Wertes des Gels und des Laufpuffers werden bei der Diskelektrophorese sehr schmale, unterschiedliche Startzonen erzeugt, wodurch auch bei niedrigen Eiweißkonzentrationen eine scharfe Trennungslinie erreicht werden kann. Somit können mit Hilfe der Diskelektrophorese, im Gegensatz zu anderen Elektrophoresearten, wesentlich mehr Banden nachgewiesen werden.

Durch die neue Abnahmemethode und vor allem durch das doppelte Siebsystem des Nasensekretes, konnten günstigere Bedingungen für die Diskelektrophorese gefunden werden. In der Regel können das Albumin, das Postalbumin, Transferrin und die verschiedenen Haptoglobuline im Normalsekret identifiziert werden.

Abb.: 13 Photographie und Schema eines diskelektrophoretisch aufgetrennten Serums.



- 1: Beta-Lipoprotein
- 2: Gammaglobulinbereich (Überlagerung verschiedener Haptoglobinarten mit Beta-I-Globulin)
- 3: Alpha-II-Makroglobulin
- 4: Prätransferrinbereich (Überlagerung verschiedener Haptoglobinarten mit Beta-I-Globulin
- 5: Transferrinbanden
- 6: Posttransferrinbereich (Überlagerung von Gc-Protein mit Alpha-II-Glykoprotein, saurem Alpha-I-Glykoprotein, Alpha-I-Antitrypsin, Inter-Alpha-Trypsininhibitor und Coerulo-plasmin)
- 7: Albuminbande

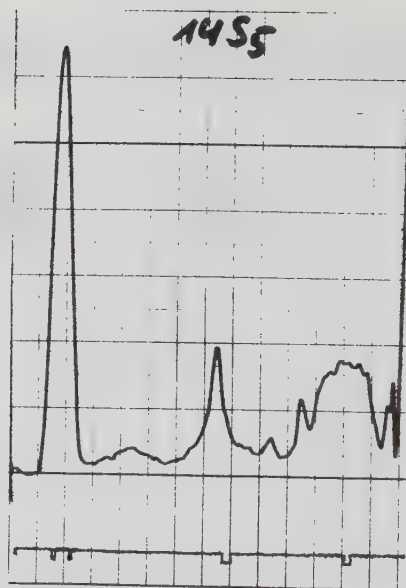
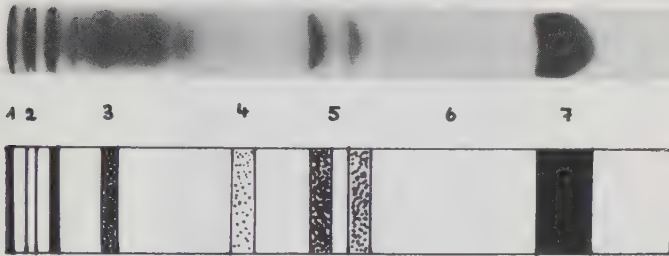


Abb.: 14 Densitometrische Darstellung der einzelnen Eiweißfraktionen eines menschlichen Serums.

Abb. 15 Photographie und Schema eines diskelektrophoretisch aufgetrennten Nasensekretes



- 1: Beta-Lipoprotein
- 2: Gammaglobulinbereich (Überlagerung verschiedener Haptoglobulinarten mit Beta-I-Globulin)
- 3: Alpha-II-Makroglobulin
- 4: Prätransferrinbereich (Überlagerung verschiedener Haptoglobulinarten mit Beta-I-Globulin
- 5: Transferrinbanden
- 6: Posttransferrinbereich (Überlagerung von Gc-Protein mit Alpha-II-Glykoprotein, saurem Alpha-I-Glykoprotein, Alpha-I-Antitrypsin, Inter-Alpha-Trypsininhibitor und Coeruloplasmin)
- 7: Albuminbande

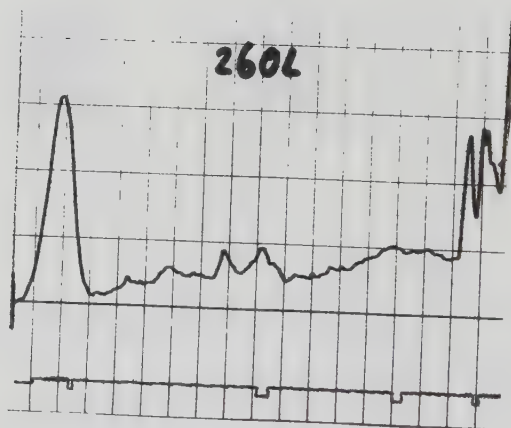


Abb.: 16 Densitometrische Darstellung der einzelnen Eiweißfraktionen im dazugehörigen Nasensekret.

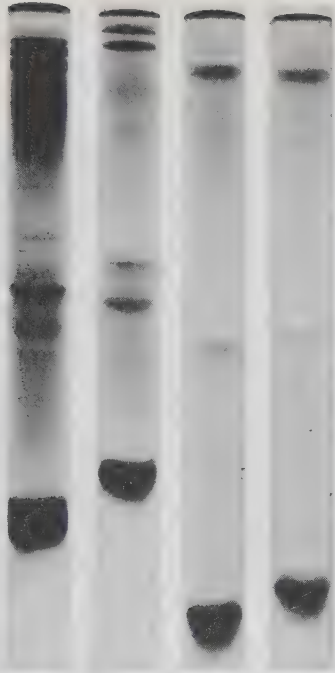


Abb.: 17 Gele mit diskelektrophoretisch aufgetrennten Nasensekreten. (Normalbefunde)

Der unterschiedliche Proteingehalt zeigt sich in der unterschiedlichen Farbintensität.

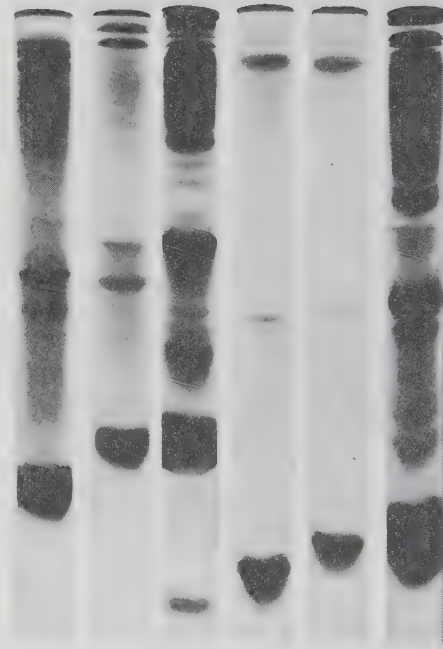


Abb.: 18 Gele mit diskelektrophoretisch aufgetrenntem Nasensekret (Gel Nr. 1, 2, 4, 5 sind Normalsekrete) im Vergleich zu Gelen mit diselektrophoretisch aufgetrenntem Serum (Nr. 3 und Nr. 6). Im Serum eindeutig stärkere Eiweißkonzentration, dadurch stärkere Farbintensität.

V)

B E S T I M M U N G
D E R
I M M U N G L O B U L I N E :

1) M e t h o d e :

Material:

LC - Partigen^R - Immundiffusionsplatten
der Behringwerke mit Antisera gegen die
Immunglobuline IgA, IgG und IgM.

Standart-Immunglobulin - Lösungen bekannter
Konzentration zum Erstellen der Eichkurve
(Für jede nachzuweisende Immunglobulin-
art sind jeweils 3 Standartlösungen nötig)

Hamilton Mikroliterspritze

Ablesegerät mit dunkler Innenseite und
Seitenbeleuchtung.

Meßschablone zum Ausmessen der Praezi-
pitationslinien.

Durchführung:

Die Meßbereiche der Immundiffusionsplatten
liegen für IgA und IgG bei 8,8 - 13,3 mg/100 ml,
für IgM bei 1,1 - 17.8 mg/100 ml.

Es wurden also zunächst Verdünnungsreihen
von den Proben angefertigt und aufgetragen,
um die am besten ablesbare Konzentration
(1:10) zu erkennen.

Die Verdünnungen wurden mit physiol. Kochsalz-
lösung hergestellt. Auf diese Konzentration
wurden alle anderen Proben verdünnt.

Auch von den 3 Standartlösungen wurden dem
Meßbereich der Immundiffusionsplatten

entsprechende Verdünnungen angefertigt.
Die ersten drei Auftragestellen wurden mit $20 \mu\text{l}$ der Standardverdünnungen gefüllt.
Die darauffolgenden 9 Auftragestellen wurden mit je $20 \mu\text{l}$ der Probenverdünnungen gefüllt.

Nach 20 Minuten wurden die Platten mit dem zugehörigen Deckel verschlossen.

Nach einer Diffusionszeit von, bei IgA- und IgG - Platten 3 Tagen, bei IgM - Platten 5 Tagen, wurden die Durchmesser der gebildeten Praezipitationsringe gemessen.

Die ersten drei Werte mit den bekannten Konzentrationen dienten dem Erstellen einer Eichkurve mit der in der Abszisse aufgetragenen Antigenkonzentration in $\text{mg}/100 \text{ ml}$ und der, in der Ordinate aufgetragenen Quadrate der Praezipitationsringdurchmesser in mm^2 .

Hieraus konnte nun die Konzentration der Proben ermittelt werden.

2) E r g e b n i s s e :

a) Gesunde Patienten:

Die Konzentration der Immunglobuline lag bei Normalseren für IgA zwischen 10,5 und 64 mg/ml (Häufigkeitsgipfel um 40 mg/100 ml).

Für IgG konnten wir Werte zwischen 10 und 50 mg/ 100 ml finden. (Häufigkeitsgipfel um 30 mg/ 100 ml).

b) Patienten mit allergischer Rhinopathie:

Wir fanden für IgA Werte zwischen 14 und 90 mg/ 100 ml und für IgG zwischen 12 und 70 mg/ 100 ml. (Häufigkeitsgipfel konnten nicht festgestellt werden).

c) Patienten mit akuter Rhinopathie:

Hier lagen die Werte für IgA zwischen 8 und 20 mg/ 100 ml und für IgG zwischen 20 und 36 mg/ 100 ml. (Auch hier konnten keine Häufigkeitsgipfel festgestellt werden).

IgM konnte im Nasensekret nicht nachgewiesen werden.

3) D i s k u s s i o n :

Diese ersten Untersuchungen zeigen einen Anstieg von Immunglobulin A und Immunglobulin G Konzentrationen im Sekret von Patienten mit allergischer Rhinopathie im Gegensatz zu Patienten mit Normalsekret, während sich das Verhältnis für IgG umgekehrt verhält.

Bei akuten Prozessen finden sich, im Vergleich zum Normalsekret, sowohl niedrigere Immunglobulin A, als auch niedrigere Immunglobulin G Konzentrationen.

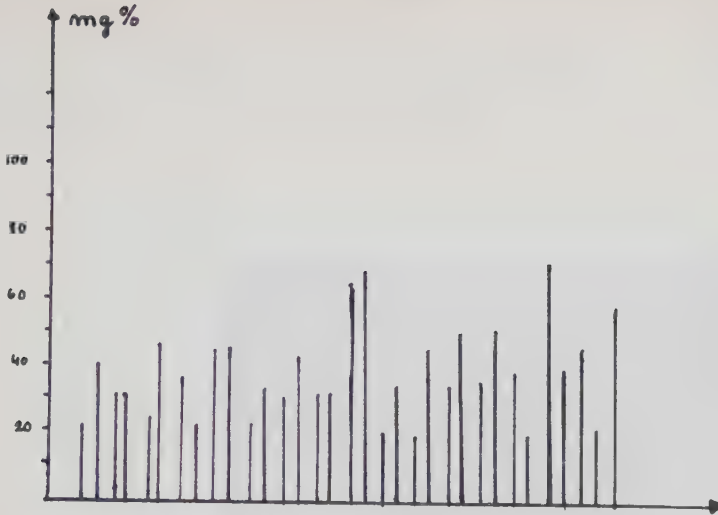


Abb.: 19: Konzentration von Immunglobulin G im Normalsekret

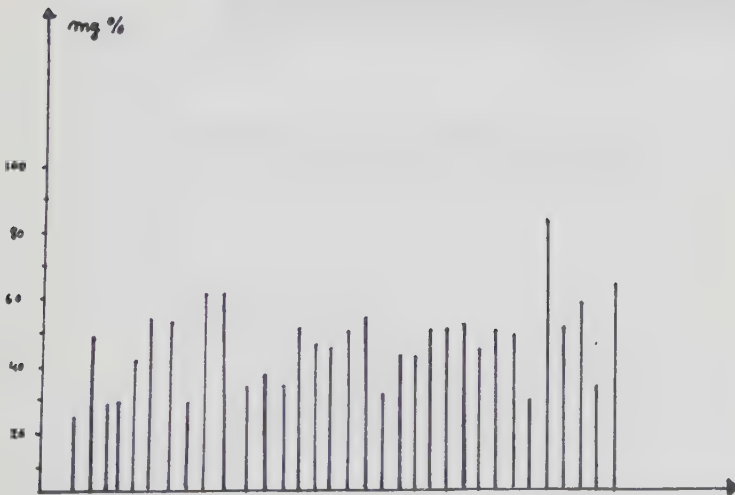


Abb. 20 : Konzentration von Immunglobulin A im Normalsekret

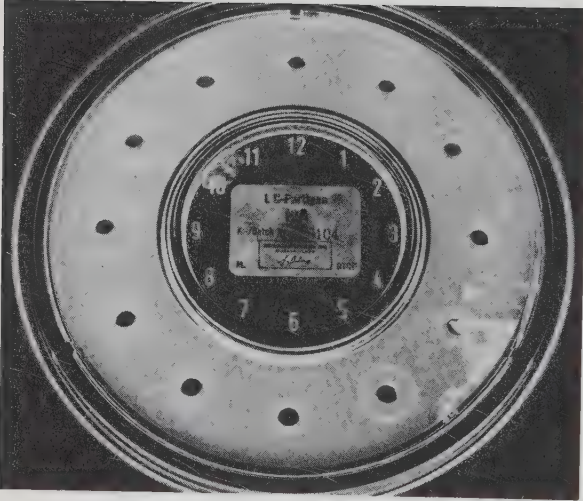


Abb.: 21 LC Partigen-Immundiffusionsplatte der
Behringwerke AG im Ablesegerät

E) Z U S A M M E N F A S S U N G :

Auf Grund der neuen Abnahmemethode von menschlichem, nativen Nasensekret konnten wir einmal auf rationelle Weise eine, für die Untersuchung ausreichende Menge Nasensekret erhalten.

Außerdem ließ sich durch diese Methode reines Sekret gewinnen, wodurch zeitraubende Aufbereitung unnötig wurde. Wir konnten eine exakte, scharf abgegrenzte, diskelektrophoretische Auftrennung der Proben ermöglichen, bei welcher der Patient wenigstmöglich belastet wird.

Auch konnte erstmalig durch die unterschiedliche Lokalisation der Sekretabnahme die anatomisch unterschiedlichen Gegebenheiten durchleuchtet werden.

Watte, bzw. Filterpapier wird an anatomisch unterschiedlichen Stellen der Nasenhaupthöhlen eingelegt und 20 bis 30 Minuten belassen.

Anschließend wird durch Auszentrifugieren durch ein doppeltes Siebsystem in Spitz-Zentrifugengläsern reines, unverdünntes Nasensekret erhalten.

Anschließend wurden folgende eiweißchemische Untersuchungen angestellt:

- 1) Gesamteiweißbestimmung
- 2) Diskelektrophoretische Auftrennung des Nasensekretes
- 3) Bestimmung der Immunglobuline

Bei der Diskelektrophorese können bis zu 10 Proteinbanden gefunden werden. Der Vergleich von Normalsekret und Serumdiskelektrophorese ergibt ein ähnliches Bandenmuster, mit jedoch wesentlich höherer Eiweißkonzentration im Serum.

Bei Gegenüberstellung von Normalsekreten und Sekreten bei allergischer, akuter und vasomotorischer Rhinopathie konnte sowohl diskelektrophoretisch, als auch durch Gesamteiweißbestimmung gezeigt werden, daß die Eiweißkonzentration bei Normalsekreten und bei allergischer Rhinopathie annähernd gleich ist. Bei vasomotorischer Rhinopathie fanden wir ein eiweißreicheres, bei akuter Rhinopathie hingegen ein eiweißärmeres Sekret.

Durch die Bestimmung der Immunglobuline konnte das Nasensekret von Patienten mit akuter Rhinopathie von dem von Normalpersonen und Patienten mit vasomotorischer und allergischer Rhinopathie abgegrenzt werden. Bei akuter Rhinopathie ist die IgG Konzentration immer höher als die Konzentration von IgA, während dieses Verhältnis sich bei den übrigen Probandengruppen umkehrt. IgM konnte im Nasensekret nicht ermittelt werden.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S :

- 1 ANDERSON, T.O., RIFF, L., JACKSON, G.: Immunelectrophoresis of nasal secretions collected during a common cold. J. Immunol. 89, 691 (1962).

- 2 BENINCASO, F.V., SMITH, M.H.D.: A suction-controlled nasal aspirator for collection of nasopharyngeal secretions. J. PEDIAT. 82 (1973) 297.

- 3 L. BONOMO. A. D'ADDABBO : ¹³¹I-Albumin turnover and loss of protein into the sputum in chronic bronchitis, Clin. Chim. Acta 10 (1964) 214.

- 4 KABAT, E.A.: Kabat and Meyer's experimental immunochemistry, 2. d. ed. Springfield (I 11.), Charles C. Thomas Publ., Kap. 7, 1961

- 5 COHEN, A.B., GOLDBERG, S., London, R.L.: Immunoglobulins in nasal secretions of infants, Clin. exp. Immunol. 6 (1970) 753.

- 6 CRAMER, I.I.: Heat and moisture exchange of respiratory mucous membrane. Ann. Otol. (St. Louis). 66 (1957) 325.

- 7 CRAMER, I.I.: Heat and moisture exchanges in respiratory mucous membrane. Int. Rhinology 1 (1963) 34.

- 8 DAVIS, B.J.: Diselectrophoresis. Material and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121 (1964) 401.

- 9 EICHNER, H., M. MÜNDEL, G. BRETZEL: Vergleichende Untersuchungen von Flussratten. Elektrolyt- und Gesamteiweißkonzentrationen und diskelektrophoretische Auftrennung des Sekretes an fraktioniert gewonnenem menschlichen Parotissekret. Laryng. Rhinol. 54 (1975) 19.

- 10 EICHNER, H., M. MÜNDEL, G. BRETZEL, H. HOCHSTRASSER: Vergleichende Untersuchungen der Proteinfractionen von menschlichem Parotissekret mittels ein- und zweidimensionaler Immunelektrophorese, Immundiffusion und Diselektrophorese, Laryng. Rhinol. 54 (1975) 105.

- 11 MANCINI, G., CARBONARA, P. O., HEREMANS, J.F.: Immunchemistry 2, 235, (1965).

- 12 HUGHES, E. C., JOHNSON, R. L.: Circadian and interpersonal variability of IgA in nasal secretions. Ann. Otol. (St. Louis) 82 (1973) 216.

- 13 INGELSTEDT, S., B. IVSTAM: The source of nasal secretion in the normal condition. Acta oto-laryng (Stockholm). 37 (1949) 445.

- 14 INGELSTEDT, S. B. IVSTAM: The source of nasal secretion in infectious allergic and experimental conditions acta oto-laryng (Stockholm) 37 (1949) 451.

- 15 ISHIZAKA, K., NEWCOMB, R.W.: Presence of in nasal washings and sputum from asthmatic patients. J. Allergy 46 (1970) 197.

- 16 KORTEGANGAS, A. E.: Funktion und Funktionsprüfung der Nase und der Nasennebenhöhlen. In: BERENDES, LINK und ZÖLLNER: Hals-Nasen-

Ohrenheilkunde in Praxis und Klinik Bd. I. (1977)

- 17 MAURER, H. R.: Diskelektrophorese. DE GRUYTER, Berlin (1968).
- 18 MELON, J.: Contribution à l'étude de l'activité sécrétoire de la muqueuse nasale. Acta oto-rhynolaryng. Belg. 22 (1968) 1.
- 19 MELON, J.: Etude comparative de la composition chimique du mucus nasal prélevé au cours des hypersécrétions d'origine réflexe et allergique. Acta oto-laryng. (Stockh.) 67 (1969) 158.
- 20 MELON, J. E. SCHOFFENIELS: La composition inorganique de la sécrétion nasale normale. Int. Rhinology 4 (1966) 71.
- 21 MYGIND, N., THOMSEN, J.: Diurnal variation of nasal protein concentration acta oto-laryng. (Stockh.) 82 (1976) 219.
- 22 MYGIND, N., WEEKE, B., ULLMAN, S.: Quantitative determination of immunoglobulins in nasal secretions. Int. Arch. Allergy 49 (1975) 99.
- 23 MYGIND, N.: Nasal allergy. Blackwell Scientific Pub. Oxford (1978).
- 24 NAUMANN, H. H., NAUMANN, W. H.: Kurze Pathophysiologie der Nase und ihrer Nebenhöhlen. In BERENDES, LINK, ZÖLLNER: Hals-Nasen-Ohrenheilkunde in Praxis und Klinik Bd. I. 1977 Thieme, Stuttgart.
- 25 NAUMANN, H. H.: Die Mikrozirkulation in der Nasenschleimhaut. Thieme, Stuttgart (1961).

- 26 NEGUS, V.: Observations on the exchange of fluid in the nose and respiratory tract. Ann. Otol. (St. Louis) 66 (1957) 344.
- 27 ORNSTEIN, L.: Diskelektrophoresis. I. background and theory. Ann. N. Y. Acad. Sci 121 (1964) 321.
- 28 ROSSEN, R. D., BUTLER, W. T., CATE, T. R., SZWED, C.F., COUCH, R. B.: Protein composition of nasal secretion during respiratory virus infection. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 119 (1965) 1169.
- 29 ROSSEN, R. D., SCHADE, A. L., BUTLER, W. T., KASEL, J. A.: The proteins in nasal secretions. J. clin. Invest. 45 (1966) 768.
- 30 RYLEY, H. C., BROGAN, T. D.: Variation in the composition of sputum in chronic chest diseases. J. exp. Path. 49 (1968) 625
- 31 RYLEY, H. C., BROGAN, T. D.: Quantitative immunoelectrophoretic analysis of the plasma proteins in the sol phase of sputum from patients with chronic bronchitis. J. clin. Path. 26 (1973) 852.
- 32 SCHORN, K., HOCHSTRASSER, K., WITTMANN, J.: Enzyme des Intermediarstoffwechsels im menschlichen Nasensekret bei physiologischem Zustand der Schleimhaut. Laryng. Rhinol. 54 (1975) 597.

- 33 K. SCHORN, K. HOCHSTRASSER, V. PASEMANN: Untersuchungen zur Transsudationsfähigkeit der menschlichen Nasenschleimhaut durch Bestimmung von Intermediärstoffwechselenzymen im Sekret bei verschiedenen inneren Erkrankungen. Laryng. Rhinol. 54 (1975) 659.
- 34 TSE K. S., WICHER, K., ARBESMAN, C. E.: Effekt of Immunotherapy on appearance of antibodies to ragweed in external secretions. J. Allergy 51 (1973) 208.
- 35 TURK, A., LICHTENSTEIN, L.M., NORMAN, P.S.: Nasal secretory antibody to inhalant allergens in allergic and non-allergic patients. Immunology 19 (1970) 85.

LEBENS LAUF

Am 23.12.1948 wurde ich als Tochter des Dr.med.Karl Theodor Arnold und seiner Frau Johanna Arnold in Oberaudorf /Inn geboren.

Von 1954 bis 1958 besuchte ich die Volksschule in Niederaudorf/Inn,

von 1958 bis 1966 die Hermann-Lietz-Schule Schloß Reichersbeuern und von 1966 bis 1968 die Werkschule Albrecht-Leo-Merz in Stuttgart, an welcher ich die Reifeprüfung ablegte.

1969 studierte ich Landwirtschaft in Weihenstephan/Freising, von 1970 bis 1971 Human-Medizin in Tübingen und 1974 Chemie in Tübingen.

Ab 1972 setzte ich das Humanmedizinstudium an der Ludwig-Maximilian Universität in München fort, wo ich 1978 das Staatsexamen ablegte.

Von 1978 bis Mai 1979 war ich im Städtischen Krankenhaus Rosenheim als Medizinalassistentin beschäftigt.

Zur Zeit arbeite ich mit meinem Vater zusammen in dessen Privatklinik.

